

**AMIDORPHIN: ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES NEUEN ENDOGENEN OPIOIDPEPTIDS**

Daniel C. Liebisch

Aus der Abteilung für Neuropharmakologie
des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie
in München

Vorstand: Prof. Dr. A. Herz

AMIDORPHIN: ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES NEUEN ENDOGENEN OPIOIDPEPTIDS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel C. Liebisch

aus

München

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Albert Herz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Forth Prof. Dr. Hans Fritz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Bernd R. Seizinger
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Juli 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. METHODEN	8
2.1. Extraktion der Gewebe	8
2.2. Radioimmunologische Bestimmungen	9
2.2.1. Herstellung des Amidorphinantiserums	9
2.2.2. Iodierung von Amidorphin	10
2.2.3. Radioimmunoassay (RIA)	10
2.2.4. Charakterisierung des Antiserums	11
2.3. Oxidation von ir-Amidorphin	12
2.4. Isolierung von Amidorphin	13
2.5. Isolierung von Amidorphin ₈₋₂₆	14
2.6. Aminosäure- und Sequenzanalysen	16
2.7. Behandlung mit Carboxypeptidase A	16
3. MATERIALIEN	18
4. ERGEBNISSE	19
4.1. Isolierung und Struktur von Amidorphin aus Rindernebennieren	19
4.2. Isolierung und Struktur von Amidorphin ₈₋₂₆ aus Rinderhirn	24
4.3. Verteilung von ir-Amidorphin in Gehirn, Hypophyse und Nebenniere verschiedener Spezies	30
4.3.1. Gewebe vom Rind	30
4.3.2. Gewebe vom Schaf	30
4.3.3. Gewebe vom Schwein	36
4.3.4. Gewebe anderer Spezies	39
5. DISKUSSION	40
6. ZUSAMMENFASSUNG	47
7. LITERATURVERZEICHNIS	49

BAM-12-P = Bovine Adrenal Medullary-12-Peptid
BAM-22-P = Bovine Adrenal Medullary-22-Peptid
ir = immunoreaktiv
HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RIA = Radioimmunoassay
POMC = Proopiomelanocortin

1. EINLEITUNG

Die Entdeckung der Opiatrezeptoren wurde vor mehr als zehn Jahren von verschiedenen Gruppen etwa gleichzeitig publiziert (Pert & Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Tere-nius, 1973). In der Folge fanden Hughes et al., 1975 zwei Pentapeptide, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, die sich als endogene Liganden für die Opiatrezeptoren erwiesen (Abb. 1). Kurz darauf wurde in der Hypophyse ein Peptid mit einer Kettenlänge von 31 Aminosäuren gefunden, dessen N-Terminus die Met-Enkephalinsequenz trägt, nämlich β -Endorphin; ferner wurden einige, am C-Terminus verkürzte Formen von β -Endorphin isoliert (Bradbury et al., 1976; Guillemin et al., 1976; Ling et al., 1976).

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

Met - Enkephalin

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Leu - Enkephalin

Abb. 1

Primärstruktur von Met- und Leu-Enkephalin

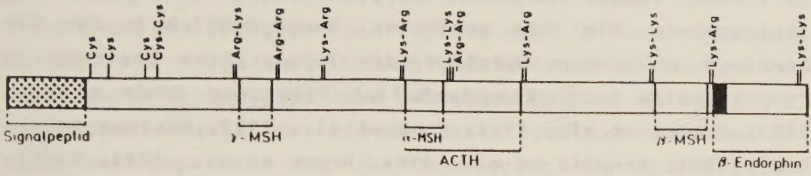
Die ursprüngliche Vermutung, daß β -Endorphin ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur Freisetzung von Met-Enkephalin ist, und daß β -Endorphin wiederum aus einem Vorläufermolekül (Precursor) stammt, das auch Leu-Enkephalin enthält, erwies sich als falsch (Mains et al., 1977; Rossier et al., 1977; Bloom et al., 1978; Duka et al., 1978; Rubinstein et al., 1978;). Die Primärstruktur des Vorläufermoleküls von β -Endorphin, Proopiomelanocortin (POMC), wurde bald bestimmt. Es

enthält die Sequenzen einer Vielzahl anderer Peptide, darunter die von ACTH und α -, β -, und γ -MSH, jedoch nicht die von Leu-Enkephalin, (Abb. 2) (Nakanishi et al., 1979.; Takahashi et al., 1981; Notake et al., 1983).

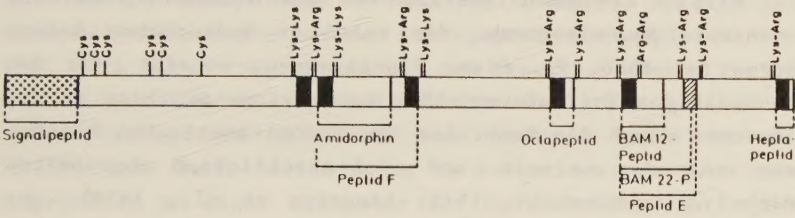
Dafür wurde ein neues Opioidpeptid gefunden, Dynorphin₁₋₁₇ (= Dynorphin A), welches eine C-terminal verlängerte Version von Leu-Enkephalin darstellt (Goldstein et al., 1979, Goldstein et al., 1981 und Tachibana et al., 1982). Ebenso konnte die Primärstruktur einiger weiterer Opioidpeptide aufgeklärt werden, welche am N-Terminus die Sequenz von Leu-Enkephalin enthalten, wie Dynorphin₁₋₈ (Minamino et al., 1980; Seizinger et al., 1981a), α - und β -Neo-Endorphin (Minamino et al., 1981, Kangawa et al., 1981), Rimorphin (= Dynorphin B) (Kilpatrick et al., 1982) und Dynorphin B₂₉ (= Leumorphin) (Suda et al., 1983).

Die Entdeckung, daß Met-Enkephalin in der Nebenniere wesentlich höher konzentriert ist, als im Gehirn, führte zu einer erweiterten Untersuchung dieses Gewebes. Es wurden dabei neue Opioidpeptide isoliert, die alle am N-Terminus die Sequenz von Met-Enkephalin tragen, und die zum Teil wesentlich opiataktiver als Met-Enkephalin selbst sind, darunter Heptapetid (= Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷) (Stern et al., 1979), Oktapeptid (= Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸) (Kilpatrick et al., 1981a), Bovine Adrenal Medullary-12-Peptid (BAM-12-P) (Mizuno et al., 1980a), BAM-22-P (Mizuno et al., 1980b), Peptid E (Kilpatrick et al., 1981a) und Peptid F (Jones et al., 1980; Kilpatrick et al., 1981b).

Durch molekulare Klonierungs- und DNA-Sequenzierungstechniken wurde nun herausgefunden, daß alle bisher gefundenen endogenen Opioidpeptide aus 3 verschiedenen Vorläufermolekülen abstammen. Der β -Endorphin-Precursor POMC wurde schon erwähnt. Die C-terminal verlängerten Leu-Enkephaline stammen aus dem Proenkephalin B- (= Prodynorphin) Precursor (Kakidani et al., 1982; Horikawa et al., 1983; Civelli et



Proenkephalin A



Proenkephalin B

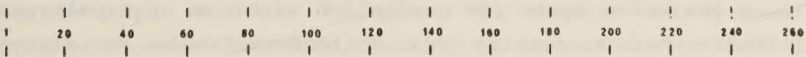
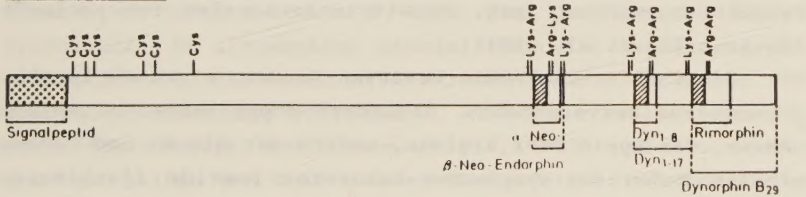


Abb. 2

Schematische Darstellung der Sequenzen der drei Opioidpeptidvorläufermoleküle Proopiomelanocortin (POMC), Proenkephalin A und Proenkephalin B. Eingezeichnet sind auch die sog. Signalsequenzen und die Sequenzen doppelbasischer Aminosäuren. Met-Enkephalin (■) Leu-Enkephalin (▨)

al., 1985) (Abb. 2). Proenkephalin B enthält 3 Leu-Enkephalinsequenzen. Die oben erwähnten, hauptsächlich in der Nebenniere gefundenen Opioidpeptide haben ihren Ursprung im Proenkephalin A- (= Proenkephalin) Precursor (Noda et al., 1982; Gubler et al., 1982; Comb et al., 1982, Martens & Herbert, 1984; Howells et al., 1984; Rosen et al., 1984; Yoshikawa et al., 1984). Dieses Vorläufermolekül trägt 6 Sequenzen von Met-Enkephalin und eine von Leu-Enkephalin (Abb. 2).

Alle 3 Precursor besitzen am N-terminalen Ende eine sogenannte Signalsequenz, die reich an hydrophoben Aminosäuren ist (Abb. 2). Diese Signalsequenz scheint für den Transport des Vorläufermoleküls nach seiner Synthese an den Ribosomen durch die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums notwendig zu sein und wird anschließend abgespalten (Blobel & Dobberstein, 1975; Lingappa et al., 1978). Das Vorläufermolekül ohne die Signalsequenz wird dann im Golgiapparat oder in den Vesikeln in die einzelnen bioaktiven Produkte gespalten (sog. "posttranslationales Processing") (Review: Loh et al. 1984).

Die Vorläufermoleküle besitzen ferner, wie auch in Abb. 2 besonders hervorgehoben, Sequenzen doppelbasischer Aminosäuren, wie Lysin oder Arginin, welche oft die N- und C-terminalen Enden der Sequenzen bekannter Peptide flankieren. Wenn eine Spaltung des Precursors stattfindet, befinden sich beide basischen Reste für gewöhnlich nicht am abgespaltenen Produkt. Das Processing des Vorläufermoleküls an diesen basischen Aminosäuren wird von Peptidasen katalysiert, die als Trypsin- und Carboxypeptidase B-artig bezeichnet werden (Review: Turner, 1984). Einige Proteasen mit Trypsin-artiger Wirkung, die am endogenen Processing von Vorläufermolekülen beteiligt sind, wurden bisher partiell charakterisiert (Mason et al., 1983; Tanaka et al., 1983); für die Bildung der Enkephaline in der Nebenniere scheint eine Thiol-Protease verantwortlich zu sein (Troy & Musaccio, 1982). Durch die

Behandlung mit Trypsin-artigen Proteasen bleibt jedoch am C-Terminus des freigesetzten Peptids noch Lysin oder Arginin zurück. Die Abspaltung dieser endständigen Aminosäure erfolgt durch Carboxypeptidase B-artigen Enzyme. Es wurde u.a. ein Enzym isoliert, das als der beste Kandidat einer endogen wirksamen Peptidase für das Processing von Neuropeptiden gilt, die sog. "Enkephalin Convertase" (Fricker & Snyder, 1983; Supattapone et al., 1984). Die "Enkephalin Convertase" ist bei der Biosynthese von Enkephalin aktiv, scheint aber auch beim Processing anderer Neuropeptide mitzuspielen.

Nach ihrer Freisetzung aus dem Precursor können Peptide modifiziert werden, was u.U. einen erheblichen Einfluß auf deren biologische Aktivität hat (Review: Mains et al., 1983), z.B. durch Acetylierung am N-Terminus, was bei Opioidpeptiden zu einer Aufhebung der Opiatwirkung führt (Seizinger et al., 1981b). Eine andere mögliche Modifikation ist die Amidierung des C-Terminus. Beispiel dafür sind viele Hormone, darunter Substanz P, LHRH, TRH, Gastrin oder Cholezystokinin. Im allgemeinen erweist sich die Amidierung als wesentlich für die hormonelle Wirkung. Die Wirkung von CRF z.B. wird 1000-fach verringert, wenn C-terminales Ala-NH₂ durch Ala ersetzt wird (Vale et al., 1981) und die deamidierten Analoga von Gastrin oder Cholezystokinin sind völlig inaktiv (Rehfeld, 1981). Damit ein Peptid endogen amidiert werden kann, muß der Precursor die Sequenz -X-Gly-basische Aminosäure- besitzen, wobei X die Aminosäure darstellt, die im fertigen Peptid amidiert ist; die basische Aminosäure kann Lysin oder Arginin sein. Glycin fungiert als Donor der Aminogruppe an die vorhergehende Aminosäure "X" und die Präsenz von Glycin scheint für die endogene Amidierung von entscheidender Bedeutung zu sein (Bradbury et al., 1982). Das Vorhandensein einer solchen Sequenz ist zwar notwendig für die endogene Amidierung eines Peptids, aber nicht genügend. Im POMC-Vorläufermolekül z.B. ist die Sequenz -Val-

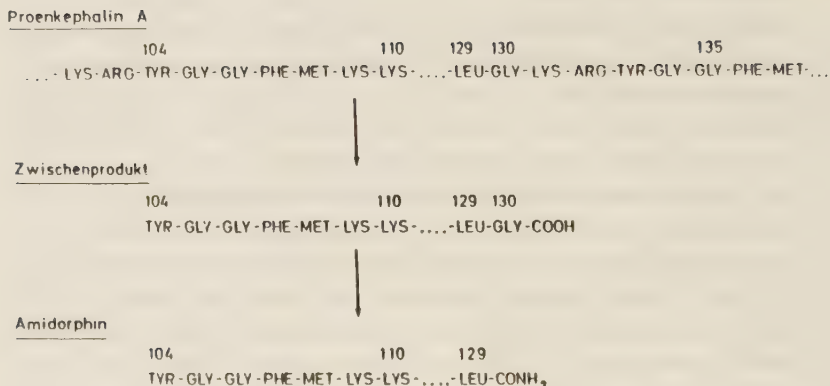


Abb. 3

Schematische Darstellung der Sequenz 102-137 des Proenkephalin A-Precursor und mutmaßliches enzymatisches Processing über ein Zwischenprodukt zu Amidorphin.

Gly-Lys-Lys- lokalisiert, die zu einer Amidierung von α -MSH führt, aber nur im Zwischenlappen der Hypophyse, nicht im Vorderlappen, wo die entsprechende Sequenz intakt als Mittelregion von ACTH₁₋₃₉ bleibt.

Im Falle der Opioidpeptide befindet sich eine solche mögliche Amidierungssequenz im Proenkephalin A-Precursor mit Glycin an Position 130 im Proenkephalin A des Rindes (Abb. 3). Bei einer möglichen Spaltung an den doppelbasischen Aminosäuren Lys-Arg und anschließender Amidierung des Leucins an Position 129 könnte ein amidiertes Opioidpeptid freigesetzt werden, das der Sequenz 104-129 im Rinderproenkephalin A entspricht, welche in der Sequenz von Peptid F enthalten ist und welches das erste isolierte amidierte Opioidpeptid darstellen würde (Im Verlauf der Arbeit wurde

von Weber et al., 1983 und Matsuo et al., 1983, die Existenz eines anderen amidierten Opioidpeptids, Metorphamid bzw. Adrenorphin genannt, publiziert).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das endogene Vorkommen dieses hypothetischen, amidierten Opioidpeptids, das von uns dann nach seiner Isolierung "Amidorphin" (Kurzform von amidiertes Endorphin) genannt wurde, zu beweisen und dessen Verteilung in diversen Organen und Spezies zu untersuchen. Die C-terminale Amidierung eines Opioidpeptids ist wissenschaftlich besonders interessant, da die Opiatwirkung über den N-Terminus des Opioidpeptids mit der Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe vermittelt wird und ein amidierter C-Terminus eine weitere, nichtopioide Funktion des Moleküls bedingen könnte.

2. METHODEN

2.1. Extraktion der Gewebe

Gehirne, Nebennieren und Hypophysen von Rind, Schaf und Schwein wurden vom Schlachthof geholt und spätestens 30 min nach Eintritt des Todes auf Eis gelegt. Die Gehirne wurden innerhalb 1 h in die entsprechenden Areale geteilt, die Hypophysen wurden in Vorder- und Hinterlappen geteilt und bei den Nebennieren wurde der Cortex von der Medulla entfernt.

Männliche Wistar-Ratten (ca. 200 g), männliche Meerschweinchen (ca. 300 g) und weibliche Hühner wurden dekapitiert. Die Gehirne wurden sofort entfernt und nach der Methode von Glovinsky & Iversen, 1966 in verschiedene Areale zerlegt, die Nebennieren wurden als Ganzes homogenisiert.

Hundehirn und -nebenieren von einem Deutschen Schäferhund (Versuchstier bei einer Herz-Lungentransplantation am Institut für Experimentelle Chirurgie, Klinikum Großhadern, München) und Affenhirn bzw. -nebenieren (von einem Makaken, der an Altersschwäche gestorben war, Institut für Medizinische Psychologie, Universität München) wurden ca. 1 h nach Eintritt des Todes auf Eis gelegt. Die Gehirne wurden in Areale zerteilt, die Nebennieren wurden als Ganzes homogenisiert.

Alle Gewebe wurden sofort nach dem Zerteilen in 0.1 M HCl (5 Teile 0.1 M HCl auf 1 Teil Gewebenaßgewicht) für 10 min gekocht. Anschließend wurden die Gewebe in einem Mixer homogenisiert und für 30 min bei 40000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden entweder für Gelfiltration oder Adsorption an XAD-2 Austauschharz weiterverwendet.

Die Wiedergewinnungsrate von Amidorphin wurde durch Zugabe von kleinen Mengen an ¹²⁵I-Amidorphin bestimmt,

welches vor Homogenisation und Zentrifugation zu Nebennierenextrakt vom Rind dazugegeben wurde. Die Wiedergewinnungsrate war bei Amidorphin für Extraktion in 0.1 M HCl größer als 85%. Damit war dieses Verfahren anderen getesteten Extraktionsverfahren, wie Extraktion in saurem Aceton bei 0°C (Aceton/ H₂O/ 12 M HCl 40:6:1 (v/v/v)) oder in 2 M Essigsäure bei 0°C in Gegenwart von Enzyminhibitoren (0.5 g/l Trypsininhibitor, 0.1 g/l Pepstatin A und 0.1 g/l Phenylmethylsulfonylfluorid) überlegen.

2.2 Radioimmunologische Bestimmungen

2.2.1. Herstellung des Amidorphinantiserums

Das Antiserum gegen Amidorphin wurde aus einem männlichen weißen Neuseelandkaninchen gewonnen. Zur Herstellung wurde synthetisches Amidorphin an Rinder-Thyroglobulin mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl gekoppelt (Höllt et al., 1978). Das Konjugat zwischen Amidorphin und Thyroglobulin (ca. 1 mg Peptid) wurde dann mit komplettem Freund's Adjuvans geschüttelt und an vielen Stellen am Kaninchenrücken intradermal injiziert. Nach 2 Auffrischungsimpfungen im Abstand von je ca. 3 Wochen (Mischung mit incompletem Freund's Adjuvans, je ca. 500 µg Peptid) wurde 3 Wochen nach der letzten Nachimmunisierung aus der Ohrvene Blut abgenommen. Nach der Gerinnung wurde bei 5000 g für 15 min zentrifugiert und das Serum wurde bei -30°C aufbewahrt.

2.2.2. Iodierung von Amidorphin

Amidorphin wurde nach der Methode von Hunter et al., 1962 iodiert. Dabei wurden 1 mCi Na^{125}I und 5 μg Amidorphin in 50 μl 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.5 gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μg Chloramin T eingeleitet und nach genau 25 sec durch Zugabe von 20 μg Natriummetabisulfit beendet. Um das ungebundene Iod zu entfernen, wurde das Gemisch durch eine Waters C-18 Kartusche filtriert. Mit 0.1 M Essigsäure wurde gewaschen, mit 2 ml n-Propanol wurde eluiert. Das Verfahren ergab eine spezifische Aktivität von ca. 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Peptid.

Das gleiche Ergebnis wurde mit einem technisch einfacherem Verfahren erzielt. Dabei wurden 5 μg Amidorphin und 1 mg PROTAG 125 (Fa. Baker Chemikalien) in 200 μl Boratpuffer (10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0.15 M NaCl, pH 8.2) gegeben. Das Gemisch wurde auf Eis gestellt. 1 mCi Na^{125}I wurde dazupipettiert. Nach 10 min wurde das Gemisch mit einer Waters C-18 Kartusche gereinigt (siehe oben). ^{125}I -Amidorphin wurde bei -30°C gelagert.

2.2.3. Radioimmunoassay (RIA)

Als RIA-Puffer wurde verwendet: 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.15 M NaCl, 0.01% Rinderserumalbumin, 0.1% Gelatine, 0.01% Thimerosal, pH 7.5. Antiserum, Standards und die zu messenden Proben wurden in geeigneter Weise mit dem RIA-Puffer verdünnt. Das Endvolumen betrug 500 μl nach Zugabe von ca. 15000 cpm ^{125}I -Amidorphin; angesetzt wurde der Assay in Polypropylenröhrchen 75 x 12 mm (5 ml Inhalt).

Nach 12 - 16 h Inkubation bei 4°C wurde das gebundene Antigen von freiem Peptid durch Zugabe von 2 ml Ethanol pro Röhrchen getrennt. Der Antikörper mit dem daran gebundenen

Peptid wurde dadurch präzipitiert und konnte durch Zentrifugation für 20 min bei 2500 g separiert werden. Der Überstand in jedem Röhrchen wurde abgesaugt und die zurückbleibende Radioaktivität wurde in einem γ -Zähler (80% Zählausbeute) bestimmt. Die RIA-Daten wurden mit dem Programm "NIHRIA", geschrieben von D. Rodbard, Y. Feldmann und M. Jaffe von den National Institutes of Health (Bethesda, USA), berechnet.

2.2.4. Charakterisierung des Antiserums

Die Spezifität des Amidorphinantiserums wurde gegen die folgenden Peptide getestet: Peptid E, Peptid F, BAM-12-Peptid, BAM-22-Peptid, Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin, Met-Enkephalin-amid, Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷, Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷-amid, Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, Metorphamid (= Adrenorphin), Dynorphin₁₋₈, Dynorphin₁₋₁₇, α/β -Neo-Endorphin, α/γ -MSH, oxidiertes Amidorphin und die amidierte und nicht-amidierte Form eines Peptids mit der C-terminalen Primärstruktur von Amidorphin (Amidorphin₂₀₋₂₆-amid bzw. Amidorphin₂₀₋₂₆-OH).

Abbildung 4 zeigt die Spezifität und Sensitivität des Amidorphinantiserums. Das Serum wurde im RIA in einer Endverdünnung von 1:2500 verwendet. Bei dieser Konzentration war das Antiserum in der Lage, maximal 30% von 15000 cpm ¹²⁵I-Amidorphin zu binden.

Amidorphin, das mit H₂O₂ oxidiert worden war, besaß gegenüber dem Amidorphinantiserum 100% Kreuzreaktivität. Die anderen, nicht in der Abbildung aufgeführten Peptide zeigten eine Kreuzreaktivität von kleiner als 0.01% gegenüber dem Amidorphinantiserum.

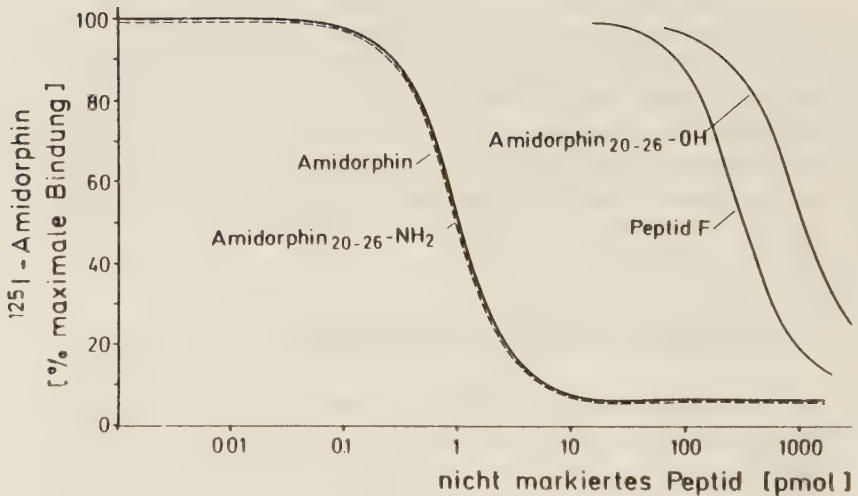


Abb. 4

Standardkurve von Amidorphin im RIA und Antiserum-Spezifität gegen Amidorphin²⁰⁻²⁶-amid, Peptid F und Amidorphin²⁰⁻²⁶-OH. Das Antiserum wurde in einer Endverdünnung von 1:2500 im RIA eingesetzt. Ca. 5000 cpm des mit ^{125}I markierten Peptids ($\approx 30\%$ der eingesetzten Radioaktivität von ca. 15000 cpm) wurden dabei maximal vom Antiserum gebunden. Die Zugabe nichtradioaktiven Peptids bewirkt eine Verdrängung des markierten Peptids von den spezifischen Bindungsstellen.

2.3. Oxidation von ir-Amidorphin

Zur vollständigen Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxyd wurden zu einem Volumen von ca. 2 ml Puffer 20 μl 30% H_2O_2 gegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei 56°C inkubiert.

2.4. Isolierung von Amidorphin

Amidorphin wurde aus Rindernebennieren isoliert, die am Schlachthof ca. 5 min nach Eintritt des Todes entnommen und auf Eis gelegt wurden. Innerhalb 1 h wurde die Nebennierenrinde entfernt und das Nebennierenmark wurde für 10 min in 0.1 M HCl gekocht. Anschließend wurde homogenisiert und zentrifugiert (60 min, 10000 g); der Überstand wurde mit n-Heptan geschüttelt, um die Lipide zu entfernen. Nach der Lyophilisation wurde der Extrakt in 35 ml 0.1 M HCl gelöst und auf eine mit Sephadex G 50 Fine-Material gefüllte Säule gegeben (5 x 90 cm), die mit 0.1 M Essigsäure eluiert wurde. Fraktionen zu 40 ml wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml/h gesammelt. Die Fraktionen, die ir-Amidorphin enthielten, wurden lyophilisiert, in 0.1 M Ammoniumacetat, pH 7.4, gelöst, zentrifugiert (30 min, 10000 g); der Überstand wurde auf eine Affinitätssäule gegeben (Säulengröße 1 x 40 cm, 0.1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 7.4, Durchflußgeschwindigkeit 0.1 ml/min, 4°C), deren Gel mit dem 3-E7-Antikörper gekoppelt war (die genaue Kopplungsprozedur ist bei Dandekar et al., 1985, beschrieben). Dieser Antikörper erkennt die Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe, die allen endogenen Opioidpeptiden N-terminal voransteht, und die für die Bindung an den Opiatrezeptor notwendig ist (Gramsch et al., 1983, enthält auch die Beschreibung des 3-E7-RIAs). Die Säule wurde mit 500 ml 0.1 M Ammoniumacetat gewaschen und mit 40 ml 2.5 M Essigsäure/1 M Ammoniumacetat eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert, in Wasser gelöst und mit HPLC weitergereinigt. Dazu wurden die folgenden HPLC-Systeme benutzt:

- a) Säule: Altex Ultrasphere ODS 5μ C_{18} (4.6 x 250 mm)
Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 /5% Methanol pH 2.7 (1 ml/l konz. H_3PO_4)
Gradient: Acetonitril 10 - 40% in 120 min
- b) Säule: Altex-Ultrapore RPSC C_3 (4.6 x 75 mm)
Puffer: 0.1% TFA
Gradient: Acetonitril 10 - 40% in 120 min
- c) Säule: Altex Ultrasphere ODS 5μ C_{18} (4.6 x 250 mm)
Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 /5% Methanol pH 7.0
Gradient: Acetonitril 10 - 30% in 120 min

Bei allen HPLC-Systemen wurden Fraktionen à 1.1 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1.1 ml/min gesammelt. Aliquots jeder Fraktion wurden auf ihren Gehalt an ir-Amidorphin untersucht. In allen drei HPLC-Systemen eluierte die gesamte Amidorphin-Immunoreaktivität jeweils als ein einziger Peak in Position von synthetischem Amidorphin. Die Fraktionen aus System c, die Amidorphin enthielten, wurden mit einer Altex Ultrasphere ODS 3μ C_{18} -HPLC-Säule (4.6 x 75 mm, Puffer 0.1% TFA, Acetonitrilgradient 10-40% in 30 min) entsalzt, bevor eine Sequenz- und Aminosäureanalyse durchgeführt werden konnte.

2.5 Isolierung von Amidorphin₈₋₂₆

10 Rinderhirne wurden am Schlachthof ca. 30 min post mortem auf Eis gelegt. Innerhalb 1 h wurden die Striata herausseziert und in 10 Volumenteilen 0.1 M HCl für 10 min gekocht. Das Gewebe wurde homogenisiert und zentrifugiert (60 min, 10000 g). Der Überstand wurde mit n-Hexan ge-

schüttelt, um die Lipide zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit 20% Trichloressigsäure (TCA) auf eine Endkonzentration von 2% TCA gebracht und für 60 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf ca. 50% des Anfangsvolumens lyophilisiert, um restliches organisches Lösungsmittel zu entfernen und über eine Säule filtriert, die mit einem XAD-2-Austauscherharz gefüllt war (Säulenvolumen 300 ml, Durchflußgeschwindigkeit ca. 400 ml/h). Mit 1 l Wasser wurde gewaschen und die adsorbierten Substanzen wurden mit 600 ml Methanol eluiert (Durchflußgeschwindigkeit ca. 500 ml/h). Das Methanol wurde unter reduziertem Druck in einem Rotationsverdampfer entfernt, das zurückbleibende Material wurde in 50 ml 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und mit den folgenden HPLC-Systemen weitergereinigt:

a) Säule: präparative Waters μ -Bondapak Alkyl-Phenyl-Reverse-Phase-Säule

Puffer: 0.1% TFA

Gradient: 5-60% Acetonitril in 180 min

Durchflußgeschwindigkeit: 3.0 ml/min

Fraktionsgröße: 9.0 ml

b) Säule: Altex Ultrasphere ODS 5μ C₁₈ (4.6 x 250 mm)

Puffer: 50 mM NaH₂PO₄/5% Methanol pH 7.0

Gradient: 0 - 30% Acetonitril in 120 min

Durchflußgeschwindigkeit: 1.1 ml/min

Fraktionsgröße: 2.0 ml

c) Säule: Altex-Ultrapore RPSC C₃ (4.6 x 75 mm)

Puffer: 0.1% TFA

Gradient: 10 - 30% Acetonitril in 120 min

Durchflußgeschwindigkeit: 1.1 ml/min

Fraktionsgröße: 2.0 ml

- d) Säule: Altex Ultrasphere ODS 3μ C₁₈ (4.6 x 250 mm)
Puffer: 50 mM NaH₂PO₄/5% Methanol pH 2.7 (1ml/1 konz. H₃PO₄)
Gradient: 10 - 30% Acetonitril in 120 min
Durchflußgeschwindigkeit: 1.1 ml/min
Fraktionsgröße: 0.55 ml
- e) Säule: Altex Ultrasphere ODS 3μ C₁₈ (4.6 x 250 mm)
Puffer: 0.1% TFA
Gradient: 10 - 50% Acetonitril in 40 min
Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 ml/min
Fraktionsgröße: 0.50 ml

2.6 Aminosäure- und Sequenzanalysen

Aminosäurezusammensetzung und -sequenz wurden von Dr. E. Weber, Univ. of Oregon, Portland, Oregon, USA und Drs. Esch und Böhlen, Salk Inst., La Jolla, Calif., USA bestimmt.

Die Gasphasensequenzanalyse wurde durchgeführt, wie bei Hunkapiller & Hood, 1983 beschrieben. Zur Aminosäureanalyse wurden die Peptide in 6 M HCl/1% Phenol hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden dann mit Phenylisothiocyanat derivatisiert und mit einer Reverse-Phase HPLC analysiert (Phenylisothiocyanat-Aminosäureanalyse, Heindrikson & Meredith, 1984).

2.7 Behandlung mit Carboxypeptidase A

Ein Gemisch von 200 pmol gereinigtem endogenem Peptid und 100 pmol synthetischem Dynorphin₁₋₈ wurde in 1500 μ l Puffer gelöst (0.02 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 0.1% Triton-X-

100, pH 7.5). Eine Suspension von 10 μ l Carboxypeptidase A (20 mg/l, Sigma Typ I), welche 200 μ g Enzym enthielt, wurde in 1.0 ml 10% LiCl gelöst. 5 μ l dieser frisch angesetzten Lösung ($\approx$ 1 μ g Enzym) wurde zu dem Peptidgemisch gegeben, dieses wurde bei 37°C inkubiert. 6 Aliquots à 20 μ l wurden nach 1, 5, 10, 60, 120 und 300 min entnommen. Um die Enzymreaktion abzustoppen, wurde jede Probe für 10 min bei 96°C inkubiert. Letztlich wurden ir-Amidorphin und ir-Dynorphin₁₋₈ gemessen (5-fach-Werte). Vor der Zugabe von Enzymlösung wurden Aliquots zur Bestimmung der Ausgangskonzentration entnommen. Dynorphin₁₋₈ wurde als nichtamidiertes Kontrollpeptid genommen, da das Antiserum gegen Dynorphin₁₋₈ hochspezifisch gegen den C-Terminus von Dynorphin₁₋₈ gerichtet war. Zur Charakterisierung des Dynorphin₁₋₈-Antiserums und der Radioimmunoassaymethode siehe Weber et al., 1982. Separate Proben des Peptidgemisches wurden mit oder ohne Enzymlösung nach ihrer zehnminütigen Inaktivierung bei 96°C für 300 min inkubiert und auf ir-Amidorphin und ir-Dynorphin₁₋₈ untersucht, um die Möglichkeit einer unspezifischen Degradierung der Peptide während der Inkubation auszuschließen.

3. MATERIALIEN

Tiere: Neuseelandkaninchen, Wistar-Ratten und Meerschweinchen (Eigene Zucht, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). Hühner (Geflügelfarm Hölzl, Moosburg). Herkunft der anderen Tiere: siehe Methodenteil

Peptide: Synthetische Peptide (Peninsula Labs., San Carlos, Ca., USA). Synthetisches Amidorphin wurde von Peninsula Labs. durch Auftragssynthese erzeugt.

Immunchemikalien: Freund's Adjuvans (Sigma, Taufkirchen).

Dynorphin₁₋₈-Antiserum (Dr. E. Weber, Univ. of Portland, Portland, Oregon, USA)

Radioaktive Substanzen: Na¹²⁵Iodid (Amersham Buchler, Braunschweig). ³H-Glycin (New England Nuclear, Dreieich)

Sonstiges: Sephadex G 50 Fine und Superfine Gelmaterial (Deutsche Pharmacia, Freiburg). XAD-2 Austauschharz (Serva, Heidelberg). C-18-Kartuschen (Waters GmbH, Königstein). Lösungsmittel für die HPLC (Merck, Darmstadt). Alle sonstigen Chemikalien (Merck, Darmstadt oder Sigma, Taufkirchen). HPLC (Beckman Instr., München) Fraktionssammler, Pumpen, γ -Zähler (LKB, Gräfelfing).

4. ERGEBNISSE

4.1. Isolierung und Struktur von Amidorphin aus Rindernebennieren

Amidorphin wurde mit Gelfiltration, Affinitätschromatographie und diversen HPLC-Systemen bis zur Homogenität gereinigt. 300 g Nebennierenmark ergaben 3 nmol ($\approx$ 8.8 ng) reines Amidorphin. Die Vorreinigung erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex G 50 Fine-Material, welches eine Auftrennung von Molekülen im Molekulargewichtsbereich 1500 Da bis 30000 Da ermöglicht und gleichzeitig höhermolekulare Anteile und kleinere Metaboliten, Salze u.ä. aus dem Gewebhomogenat vom ir-Peak abtrennt, welche unter Umständen in der Affinitätschromatographie stören können. Endogenes Amidorphin eluierte hier als Einzelpeak in Position von synthetischem Amidorphin (von Peninsula Labs, Ca., USA, synthetisiert), welcher mit Affinitätschromatographie weitergereinigt wurde. Diese Säule enthielt ein Sepharosegel, an das ein monoklonaler Antikörper gekoppelt war, der gegen die Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe gerichtet war ("3-E7"), die den Aminoterminus aller endogenen Opioidpeptide bildet. Durch die Affinitätschromatographie wurden also alle endogenen Opioidpeptide isoliert, welche in der Gelfiltration zuvor an Position von endogenem Amidorphin eluierten. Die weitere Reinigung erfolgte mit 3 HPLC-Systemen, durch die Amidorphin bis zur Homogenität purifiziert wurde. Abb. 5 zeigt den letzten HPLC-Reinigungsschritt (Nr. c, siehe "Methoden"). Der UV-Absorptionspeak mit einer Retentionszeit von 84 min (Peak A) eluierte in Position von synthetischem Amidorphin. Er wurde auch vom Amidorphinantiserum erkannt, das spezifisch gegen den C-Terminus von Amidorphin gerichtet ist. Ebenso wurde der Peak von dem monoklonalen 3-E7-Antikörper erkannt, der spezifisch gegen den N-Terminus von Opioidpep-

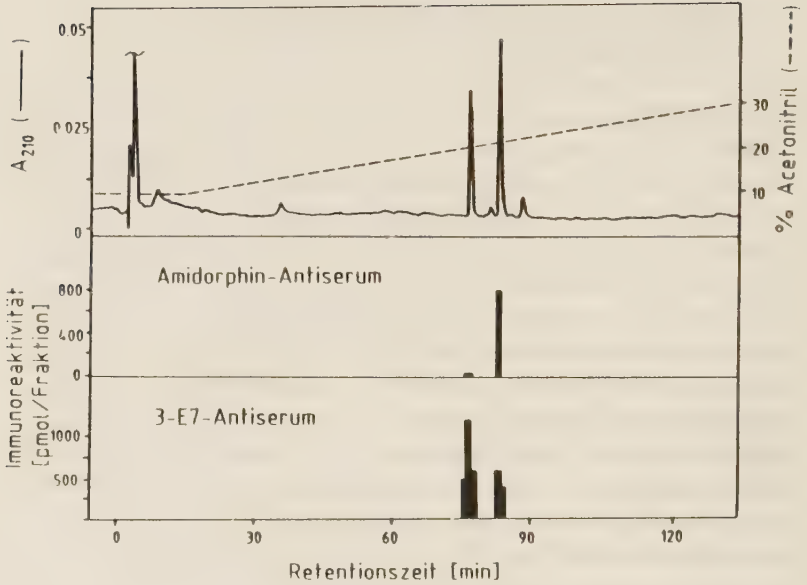


Abb. 5

Letzter HPLC-Reinigungsschritt (Schritt c, siehe "Methoden") von Amidorphin aus Rindernebennieren. Oben: UV-Absorptionsprofil, gemessen bei 210 nm. Mitte: Amidorphin-Immunoreaktivität. Unten: Immunreaktives Profil des monoklonalen 3-E7-Antikörpers, der selektiv die Anfangssequenz von Opioidpeptiden (Tyr-Gly-Gly-Phe) erkennt.

tiden gerichtet ist.

Tabelle 1

Gasphasen-Sequenzanalyse von Amidorphin

Nr.	Amino- säure	Ausbeute (pmol)	Nr.	Amino- säure	Ausbeute (pmol)
1	Tyr	165	15	Glu	40
2	Gly	52	16	Val	26
3	Gly	83	17	Glu	38
4	Phe	66	18	Glu	32
5	Met	168	19	Glu	49
6	Lys	16	20	Ala	43
7	Lys	40	21	Asn	36
8	Met	96	22	Gly	35
9	Asp	48	23	Gly	47
10	Glu	45	24	Glu	20
11	Leu	60	25	-	-
12	Tyr	85	26	-	-
13	Pro	41	27	-	-
14	Leu	61			

340 pmol Amidorphin wurden in einen Applied Biosystem 470 A Proteinsequenzer geladen. Zur Umwandlung der Anilinthiazolinon-Aminosäuren wurde Trifluoressigsäure benutzt. Die Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden durch HPLC auf einer IBM-Cyanpropylsäule identifiziert.

Die Sequenzbestimmung (Tabelle 1) ergab ein eindeutiges Ergebnis für die Analyse dieses Peaks. Die 24 Aminosäuren, die durch einen automatischen Edmann-Abbau identifiziert wurden, stimmten mit der Sequenz von synthetischem Amidorphin überein. Die Aminosäureanalyse (Tabelle 2) zeigte die Anwesenheit von 26 Aminosäuren, von denen 24 mit denen identisch waren, die durch die Sequenzanalyse bestimmt wurden. Die restlichen zwei, Valin und Leucin, sind auch in der Sequenz des Proenkephalin A-Precursors erhalten und konnten so dem C-Terminus von Amidorphin zugeordnet werden.

Tabelle 2

Aminosäurezusammensetzung von endogenem Amidorphin
aus Rinderstriatum

Amino- säure	Reste pro Molekül	gerundeter Wert	erwarteter Wert
Asx	2.19	2	2
Glx	5.97	6	6
Gly	4.18	4	4
Ala	1.16	1	1
Val	1.87	2	2
Met	1.65	2	2
Leu	2.98	3	3
Tyr	1.93	2	2
Phe	0.83	1	1
Lys	1.75	2	2
Pro	1.19	1	1
Thr	0	0	0
Ser	0.36	0	0
Ile	0	0	0
His	0	0	0
Trp	0	0	0
Arg	0	0	0
Cys	0	0	0

Diese Tabelle entspricht dem Durchschnitt 4 verschiedener Hydrolysen von Amidorphin. Die Werte wurden nicht auf Hydrolyseverlust korrigiert. Cys wurde als Cysteinsäure bestimmt.

Die Präsenz einer C-terminalen Amidgruppe wurde durch ein Experiment bestätigt, bei dem endogenes Amidorphin mit Carboxypeptidase A behandelt wurde, einer Exopeptidase, welche Peptide oder Proteine von der C-terminalen Aminosäure her spaltet. Die Reaktion funktioniert jedoch nicht, wenn diese Aminosäure, hier durch Amidierung, modifiziert ist. Als Kontrolle wurde synthetisches Dynorphin₁₋₈ gewählt, welches nicht amidiert ist, und wobei ein spezifisch gegen

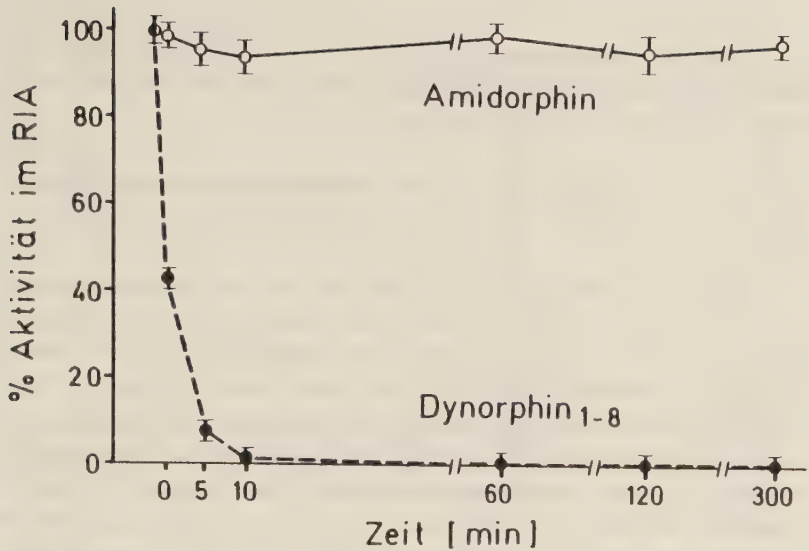


Abb. 6

Einwirkung von Carboxypeptidase A auf endogenes Amidorphin (weiße Kreise) und synthetisches Dynorphin₁₋₈ (schwarze Kreise). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 5 Einzelbestimmungen.

den Carboxyterminus von Dynorphin₁₋₈ gerichteter Antikörper existierte (Weber et al., 1982). Wie aus Abb. 6 zu entnehmen ist, war endogenes Amidorphin nach Behandlung mit Carboxypeptidase A für mindestens 5 Stunden in der Konzentration unverändert, wogegen Dynorphin₁₋₈ schon nach 10 min vollständig abgebaut wurde. Die Amidierung wurde weiterhin durch die immunologische Spezifität des Amidorphinantiserums bestätigt, welches den nichtamidierten C-Terminus von Amidorphin praktisch nicht erkennt.

Es kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß Amidorphin am C-Terminus amidiert ist und daß die vollständige Primärstruktur des Peptids lautet:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Lys-Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-Pro-Leu-Glu-Val-Glu-Glu-Glu-Ala-Asn-Gly-Gly-Glu-Val-Leu-NH₂

Peak B in HPLC c (Abb. 5) wurde vom Amidorphinantiserum praktisch nicht erkannt, aber wie Peak A, vom 3-E7-Antiserum. Eine vorläufige Sequenz- und Aminosäureanalyse bestätigte die Reinheit des Peaks und ließ vermuten, daß es sich hier entweder um die nichtamidierte Form von Amidorphin oder um die nichtamidierte, C-terminal mit Glycin verlängerte Form von Amidorphin handelt (Daten hier nicht gezeigt). Gegenwärtig werden beide Peptide synthetisiert, um durch Komigration einer der beiden Peptide mit Peak B dessen Identität zu bestätigen (Ergebnis lag bis zum Ende der Promotion noch nicht vor).

4.2. Isolierung und Struktur von Amidorphin₈₋₂₆ aus Rinderhirn

Bei der Untersuchung der Verteilung von Amidorphin in Gehirn und Hypophyse des Rindes wurde gefunden, daß Amidorphin im Gehirn bevorzugt als ir-Form mit niedrigerem Molekulargewicht als Amidorphin selbst auftritt (siehe dazu Abs. 4.3), die ebenfalls vom Amidorphinantiserum erkannt wurde. Diese N-terminal verkürzte ir-Form erwies sich als Amidorphin₈₋₂₆.

Amidorphin₈₋₂₆ wurde aus Rinderstriatum isoliert. Die Isolierung durch eine ähnliche Prozedur, wie bei der

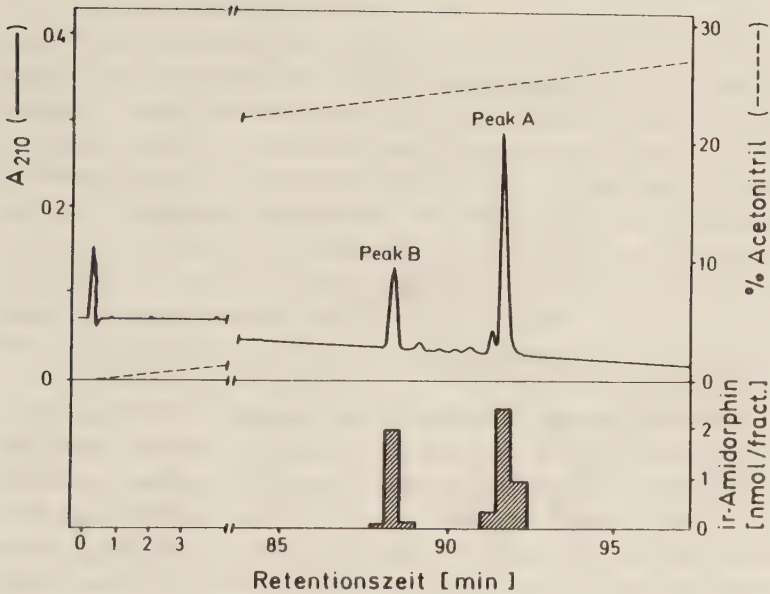


Abb. 7

HPLC-Reinigungsschritt d (siehe "Methoden") von Amidorphin₈₋₂₆ aus Rinderstriatum. Oben: UV-Absorptionsprofil, gemessen bei 210 nm. Unten: Amidorphin-Immunoreaktivität

Isolierung von Amidorphin beschrieben, aber mit einem Affinitätsgel, an das Amidorphinantikörper gekoppelt waren, führte zu einer zu kleinen Ausbeute an Amidorphin₈₋₂₆ nach Affinitätschromatographie, um Sequenz- und Aminosäureanalysen durchführen zu können. Deshalb wurde ein anderer Weg beschritten. Die Vorreinigung erfolgte dabei durch Präzipitation der Proteinanteile des Gewebehomogenats mit Trichlor-essigsäure, anschließende Adsorption an XAD-2 Austauscherharz und einen präparativen HPLC-Lauf. Die Endreinigung erfolgte durch 4 analytische HPLC-Läufe, deren letzter gleichzeitig die notwendige Entsalzung für die Sequenz- und

Aminosäureanalyse mit sich brachte. Zwei getrennte Reinigungen von je 10 Rinderstriata ergaben im Mittel 3 nmol reines Amidorphin₈₋₂₆. Abb. 7 zeigt optische Dichte und ir-Verteilung bei HPLC-Schritt d (siehe "Methoden"). Beide Haupt-UV-peaks (Peak A und B) wurden vom Amidorphinantiserum erkannt, das gegen den C-Terminus von Amidorphin gerichtet ist, wie erwartet nicht jedoch vom 3-E7-Antiserum, welches den Aminoterminus von Opioidpeptiden erkennt, der bei Amidorphin₈₋₂₆ fehlt. Beide Peaks wurden anschließend in einem letzten Schritt entsalzt und gereinigt (Schritt e, siehe "Methoden").

Die Aminosäure- und Sequenzanalyse von Peak A und B bewies eindeutig, daß die Primärstruktur für beide Peaks mit der Sequenz 8-26 von Amidorphin identisch ist (siehe Tabellen 3 und 4, Daten nur für Peak A gezeigt). Die C-terminale Amidierung beider Peaks wurde, wie bei Amidorphin, durch Behandlung mit Carboxypeptidase A und durch die immunologische Eigenschaft des Amidorphinantiserums, den C-Terminus von Amidorphin hochspezifisch zu erkennen, bewiesen. Abb. 8 zeigt für Peak A (Ergebnisse für Peak B nicht gezeigt), daß ir-Amidorphin₈₋₂₆ über einen Zeitraum von 5 h stabil blieb, wogegen Dynorphin₁₋₈ durch Carboxypeptidase A schon nach 5 min praktisch vollständig abgebaut wurde.

Die Oxidation von Peak A mit H₂O₂ ergab eine kürzere Retentionszeit auf der HPLC-Säule, die identisch mit der von Peak B war. Oxidation von Peak B veränderte die Retentionszeit dieses Peptids nicht. Es kann somit angenommen werden, daß Peak B die oxidierte Form von Peak A darstellt. Da Amidorphin₈₋₂₆ einen Methioninrest enthält, ist eine teilweise Oxidation dieses Peptides im Verlauf der Reinigung prinzipiell möglich.

Tabelle 3

Gasphasen-Sequenzanalyse von Amidorphin₈₋₂₆ (Peak A)

Nr.	Amino- säure	Ausbeute (pmol)	Nr.	Amino- säure	Ausbeute (pmol)
1	Met	269	11	Glu	148
2	Asp	62	12	Glu	149
3	Glu	201	13	Ala	92
4	Leu	218	14	Asn	73
5	Tyr	224	15	Gly	74
6	Pro	128	16	Gly	94
7	Leu	146	17	Glu	57
8	Glu	148	18	Val	40
9	Val	132	19	Leu	12
10	Glu	147	20	-	-

330 pmol des gereinigten Peptids (Peak A in Abb. 7) wurden in einen Applied Biosystem 470 A Protein Sequenzer geladen. Zur Umwandlung der Anilinthiazolinon-Aminosäuren wurde Trifluoressigsäure benutzt. Die Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden durch HPLC auf einer IBM-Cyanpropylsäule identifiziert.

Tabelle 4

Aminosäurezusammensetzung von endogenem Amidorphin₈₋₂₆
aus Rinderstriatum

Amino- säure	Reste pro Molekül	gerundeter Wert	erwartete Wert
Asx	1.76	2	2
Glx	6.05	6	6
Gly	2.17	2	2
Ala	1.05	1	1
Pro	1.02	1	1
Tyr	0.99	1	1
Val	1.79	2	2
Met	0.76	1	1
Leu	2.87	3	3
His	0.00	0	0
Ser	0.19	0	0
Arg	0.22	0	0
Thr	0.09	0	0
Cys	0.00	0	0
Ile	0.00	0	0
Phe	0.02	0	0
Lys	0.00	0	0

Diese Tabelle entspricht dem Durchschnittsergebnis 4 verschiedener Hydrolysen von Amidorphin₈₋₂₆ (Peak A in Abb. 7). Die Werte wurden nicht auf Hydrolyseverlust korrigiert. Cys wurde als Cysteinsäure bestimmt.

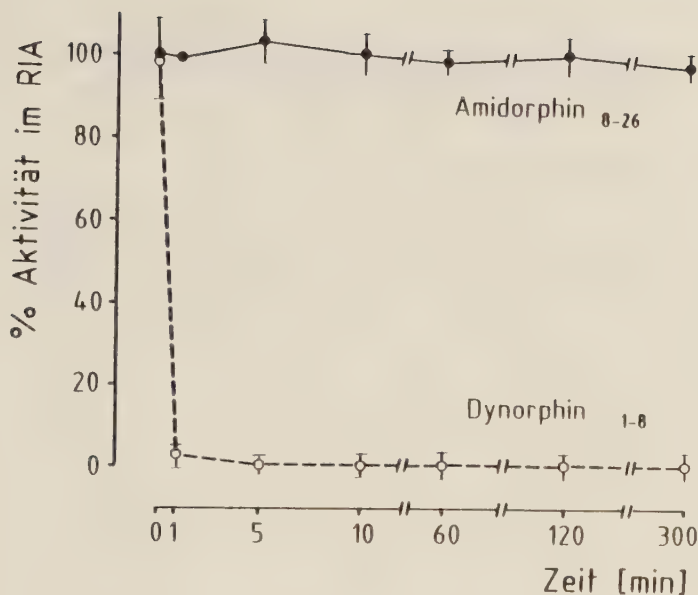


Abb. 8

Einwirkung von Carboxypeptidase A auf endogenes Amidorphin₈₋₂₆ (schwarze Kreise) und synthetisches Dynorphin₁₋₈ (weiße Kreise). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 5 Einzelbestimmungen.

Die Primärstruktur beider Peptide ist also identisch und lautet:

Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-Pro-Leu-Glu-Val-Glu-Glu-Glu-Ala-Asn-Gly-Gly-Glu-Val-Leu-NH₂

4.3. Verteilung von ir-Amidorphin in Gehirn, Hypophyse und Nebenniere verschiedener Spezies

4.3.1. Gewebe vom Rind

Abb. 9 und 10 zeigen die Verteilung von ir-Amidorphin nach Gelfiltration und HPLC in Extrakten von Nebenniere, Hypophyse, Hypothalamus und Striatum. Praktisch die gesamte Immunoreaktivität aus der Nebenniere eluierte in Gelfiltration und HPLC an Position von synthetischem Amidorphin. Im Gegensatz dazu eluierte der Großteil der Amidorphin-Immunoreaktivität aus Hypophyse und Hypothalamus und die gesamte Immunoreaktivität aus dem Striatum in Gelfiltration und HPLC an Position von Amidorphin₈₋₂₆. Ein Teil von ir-Amidorphin im Hypothalamus (27%) und in der Hypophyse (13%), aber keine Immunoreaktivität im Striatum eluierte in der HPLC an Position von synthetischem Amidorphin. Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen von Amidorphin und Amidorphin₈₋₂₆ in Gehirn, Hypophyse und Nebenniere des Rindes. Die höchste Konzentration von Amidorphin wurde in der Nebenniere gefunden, wogegen Amidorphin₈₋₂₆ in der Hypophyse besonders hoch konzentriert ist.

4.3.2. Gewebe vom Schaf

Amidorphin-Immunoreaktivität aus der Nebenniere vom Schaf eluierte in der Gelfiltration in zwei Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (Abb. 11). Peak A komigrierte in der Gelfiltration mit synthetischem Amidorphin, wogegen Peak B ein Molekulargewicht von 6000-7000 Da zeigte und als möglicher Vorläufer von Amidorphin anzusehen ist. Da das Amidorphinantiserum hochspezifisch gegen den C-Terminus des Peptids gerichtet ist und C-terminal verlängerte Formen

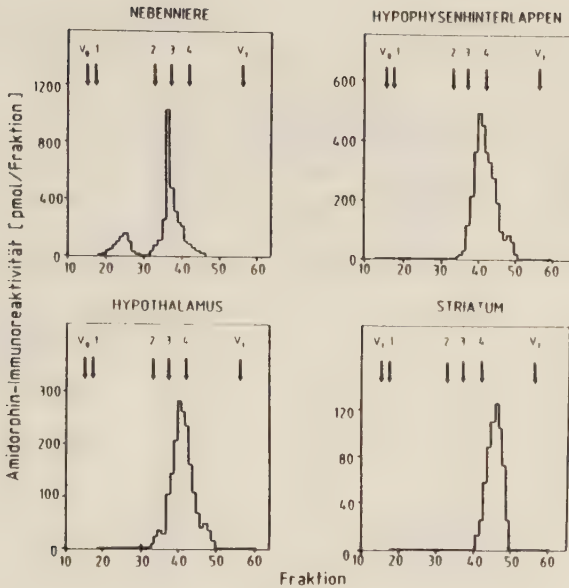


Abb. 9

Ir-Amidorphin in Gewebe vom Rind nach Gelfiltration über Sephadex G 50 Superfine. V_0 = Leervolumen der Säule (bestimmt durch Dextranblau); V_t = Gesamtvolumen der Säule (bestimmt durch $^3\text{H-Gly}$); 1 = B-LPH (Schwein) (Mol. Gew. = 11500 Da); 2 = B-Endorphin (Mol. Gew. = 3466 Da); 3 = synthet. Amidorphin (Mol. Gew. = 2948); 4 = Dynorphin₁₋₁₇ (Mol. Gew. = 2148)

praktisch nicht erkannt werden, muß es sich bei Peak B um eine N-terminal verlängerte Form von Amidorphin handeln.

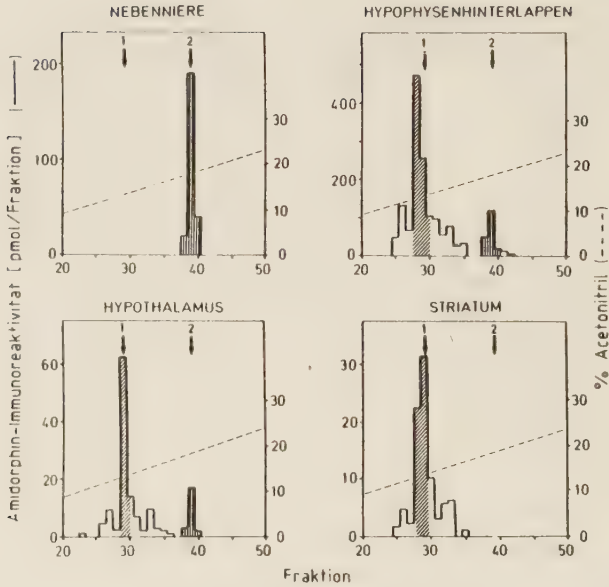


Abb. 10

1r-Amidorphin nach HPLC aus Gewebe vom Rind. Gelfiltrationsfraktionen, die 1r-Amidorphin enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Vor Aufgabe auf die HPLC wurden die Proben oxidiert (siehe "Methoden"), um durch vollständige Oxidation der Methioninreste zu Methioninsulfoxid ein reproduzierbares Elutionsmuster zu erhalten. Im benutzten Elutionssystem eluierte die oxidierte Form von Amidorphin mit kürzerer Retentionszeit als nichtoxidiertes Amidorphin. (1 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin₈₋₂₆; 2 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin)

Tabelle 5

Verteilung von Amidorphin und Amidorphin₈₋₂₆
in Gewebe vom Rind

Gewebe	Gesamt- IR-AM (pmol/g)	AM (pmol/g Gewebe)	AM ₈₋₂₆ (pmol/g Gewebe)	Verhältnis AM:AM ₈₋₂₆
Nebenniere	1380	1380	<0.2	nur AM
Hypophysen- hinterlappen	5210	680	3380	0.2
Hypothalamus	640	170	430	0.40
Mittelhirn	150	47	100	0.47
Hirnstamm	110	22	73	0.30
Striatum	440	<0.2	350	nur AM ₈₋₂₆

Die Gesamtimmunoreaktivität (Gesamt-IR) von Amidorphin (AM) wurde nach Gelfiltration bestimmt (gesammelte Extrakte aus 8 Geweben). Authentisches Amidorphin und Amidorphin₈₋₂₆ wurden durch HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 10).

Peak A zeigte in der HPLC eine etwas kürzere Retentionszeit als synthetisches (Rinder-)Amidorphin (Abb. 12). Es muß sich bei dieser ir-Form um das äquivalente Amidorphin handeln (Schaf-Amidorphin), denn das Peptid wird vom Amidorphin-Antiserum erkannt, welches hochspezifisch den C-Terminus von Amidorphin erkennt und die C-terminale Amidgruppe als Bindungsstelle benötigt. Darüberhinaus wird das Peptid auch vom monoklonalen 3-E7-Antikörper erkannt (Daten nicht gezeigt), der spezifisch gegen die N-terminale Tyr-Gly-Gly-Phe Sequenz von Opioidpeptiden gerichtet ist. In Analogie zum Rind enthalten Schafhypophyse und -gehirn vorwiegend eine immuno-reaktive Form mit niedrigerem Molekulargewicht und kürzerer Retentionszeit auf der HPLC als Schaf-amidorphin (Abb. 11 und 12). Dieses Peptid wurde nicht vom monoklonalen 3-E7-An-

Tabelle 6

Gesamtimmunoreaktivität von Amidorphin im Vergleich
mit authentischem Amidorphin beim Schaf

Gewebe	Gesamtimmuno- reaktivität (pmol/g)	authentisches Amidorphin (pmol/g)	authentisches Amidorphin (in % der Gesamt- immunoreaktivität)
Nebenniere	3600	3050	85
Hypophysen- hinterlappen	200	70	35
Hypothalamus	200	100	50
Striatum	220	15	7
Mittelhirn	180	70	39
Hirnstamm	150	60	40

Die Gesamtimmunoreaktivität von Amidorphin wurde nach Gel-filtration bestimmt (gesammelte Extrakte aus 8 Geweben). Authentisches Amidorphin wurde durch HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 12).

tiserum erkannt; es handelt sich somit vermutlich um die entsprechende Form des Schaf-Amidorphin₈₋₂₆. Tabelle 6 zeigt den Gehalt an Schaf-Amidorphin im Vergleich zur Gesamtimmunoreaktivität. Die höchste Konzentration an authentischem Schaf-Amidorphin findet sich, wie beim Rind, in der Nebenniere.

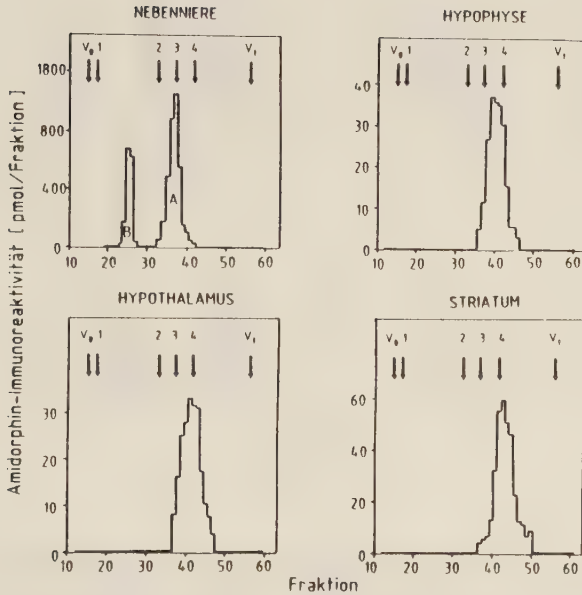


Abb. 11

Ir-Amidorphin in Gewebe vom Schaf nach Gelfiltration über Sephadex G 50 Superfine. V_0 = Leervolumen der Säule (bestimmt durch Dextranblau); V_t = Gesamtvolumen der Säule (bestimmt durch H-Gly); 1 = β -LPH (Schwein) (Mol. Gew. = 11500 Da); 2 = β -Endorphin (Mol. Gew. = 3466 Da); 3 = synthet. Amidorphin (Mol. Gew. = 2948); 4 = Dynorphin₁₋₁₇ (Mol. Gew. = 2148)

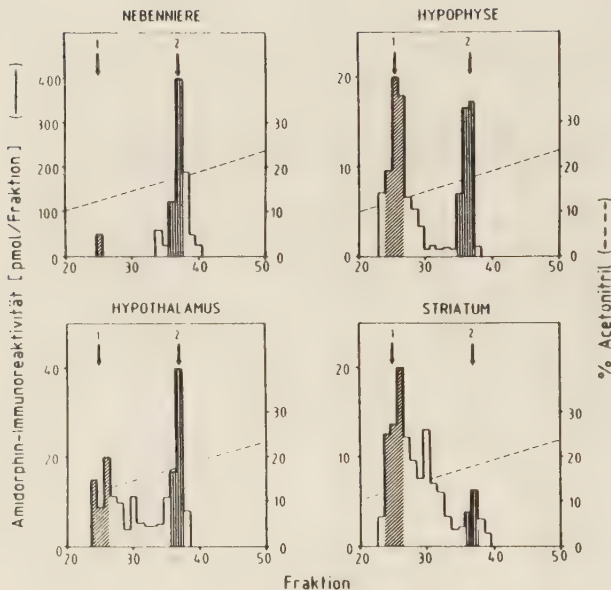


Abb. 12

Ir-Amidorphin nach HPLC aus Gewebe vom Schaf. Gelfiltrationsfraktionen, die ir-Amidorphin enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Vor Aufgabe auf die HPLC wurden die Proben oxidiert (siehe "Methoden"), um durch vollständige Oxidation der Methioninreste zu Methioninsulfoxid ein reproduzierbares Elutionsmuster zu erhalten. Im benutzten Elutionssystem eluierte die oxidierte Form von Amidorphin mit kürzerer Retentionszeit als nichtoxidiertes Amidorphin. (1 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin₈₋₂₆; 2 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin)

4.3.3. Gewebe vom Schwein

Ir-Amidorphin aus Schweinenebenniere, -hypophyse und -gehirn eluierte in der Gelfiltration in einem ähnlichen Muster wie bei den entsprechenden Geweben von Rind und Schaf (Daten nicht gezeigt). In der HPLC eluierte praktisch die

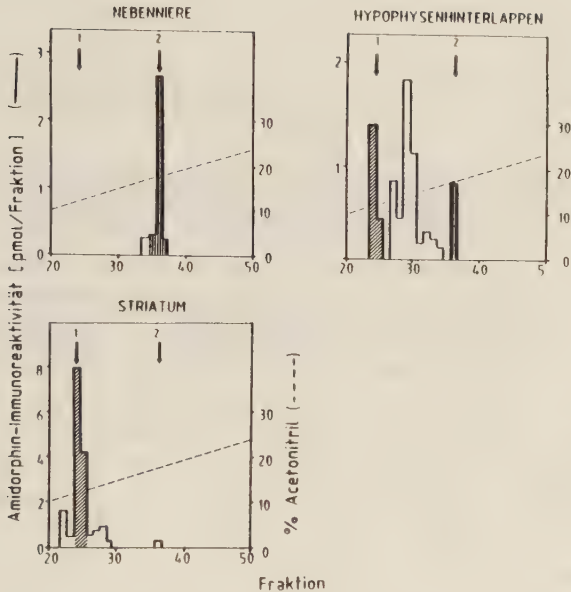


Abb. 13

Ir-Amidorphin nach HPLC aus Gewebe vom Schwein. Gelfiltrationsfraktionen, die ir-Amidorphin enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Vor Aufgabe auf die HPLC wurden die Proben oxidiert (siehe "Methoden"), um durch vollständige Oxidation der Methioninreste zu Methioninsulfoxid ein reproduzierbares Elutionsmuster zu erhalten. Im benutzten Elutionssystem eluierte die oxidierte Form von Amidorphin mit kürzerer Retentionszeit als nichtoxidiertes Amidorphin. (1 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin₈₋₂₆; 2 = Elutionsposition von Rinder-Amidorphin)

gesamte Amidorphin-Immunoreaktivität aus der Nebenniere an Position von Schaf-Amidorphin, d.h. sie zeigte eine etwas verkürzte Retentionszeit gegenüber Rinder-Amidorphin (Abb. 13). Bei den Extrakten von Gehirn und Hypophyse eluierte ir-Amidorphin in der Gelfiltration an einer Position, die einem kleineren Molekulargewicht entspricht und in der HPLC

Tabelle 7

Gesamtimmunoreaktivität von Amidorphin im Vergleich
mit authentischem Amidorphin beim Schwein

Gewebe	Gesamtimmuno- reaktivität (pmol/g)	authentisches Amidorphin (pmol/g)	authentisches Amidorphin (in % der Gesamt- immunoreaktivität)
Nebenniere	65	65	100
Hypophysen- hinterlappen	50	6	12
Striatum	65	65	<0.3
Mittelhirn	15	3	20

Die Gesamtimmunoreaktivität von Amidorphin wurde nach Gel-
filtration bestimmt (gesammelte Extrakte aus 8 Geweben).
Authentisches Amidorphin wurde durch HPLC-Analyse bestimmt
(Abb. 13).

mit kürzerer Retentionszeit, und dürfte, in Analogie zu Rind
und Schaf, aus der N-terminal verkürzten Form (Schweine-Ami-
dorphen₈₋₂₆) von Amidorphin bestehen.

Tabelle 7 führt die Konzentration von ir-Amidorphin im
Schwein auf. Da die Primärstruktur von Schweine-Amidorphin
nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß
diese - im Vergleich zu Rind und Schaf - relativ niedrigen
Konzentrationen (siehe Tabellen 5 und 6) auf eine geringere
Kreuzreaktivität des Amidorphinantiserums aufgrund einer
unterschiedlichen Primärstruktur im C-terminalen, immunore-
aktiven Teil von Schweine-Amidorphin zurückzuführen ist.

4.3.4. Gewebe anderer Spezies

Amidorphin-Immunoreaktivität konnte auch und Gehirn vom Hund nach Gelfiltration und HPLC werden (Daten hier nicht gezeigt). Da die Messung wurde, am unteren Ende der Nachweisgrenze Aussage über die ir-Verteilung nicht verlässig. Amidorphin-Immunoreaktivität scheint aber ebenso, wie bei Schaf und Schwein in authentischer und verkürzter Form zu kommen. Kein ir-Amidorphin wurde in den Geweben von Ratte, Meerschweinchen und Huhn gefunden (Nachweisgrenze pmol/g Gewebe).

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung und Charakterisierung eines neuen endogenen, C-terminal amidierten Opioidpeptids, Amidorphin, welches aus dem Opioidpeptid-vorläufermolekül Proenkephalin A stammt, beschrieben. Weiterhin wurde die Verteilung von Amidorphin in den Geweben verschiedener Spezies untersucht. Dabei wurde ir-Amidorphin in Gehirn, Hypophyse und Nebenniere von Rind, Schwein, Schaf und Hund gefunden. Die Konzentration von Amidorphin ist in der Größenordnung vergleichbar mit der Konzentration anderer endogener Hauptgenprodukte von Proenkephalin A in diesen Geweben, wie Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ und Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (Hughes et al., 1977; Rossier et al., 1980; Lindberg et al., 1983, Giraud et al., 1984, Pittius et al., 1985).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde von 2 Gruppen gleichzeitig die Existenz eines anderen, C-terminal amidierten Opioidpeptids aus dem Proenkephalin A System veröffentlicht, das von Matsuo et al., 1983, "Adrenorphin" und von Weber et al., 1983, "Metorphamid" genannt wurde. Dieses Oktapeptid, dessen Sequenz den ersten 8 N-terminalen Aminosäuren von Peptid E entspricht, ist jedoch in der Nebenniere in einer Konzentration enthalten, die um beinahe 2 Größenordnungen unter der von Amidorphin liegt. Die hohen Konzentrationen, in denen Amidorphin in der Nebenniere und im hypothalamo-hypophysären System vorgefunden wird, lassen vermuten, daß Amidorphin ein Hauptgenprodukt des Proenkephalin A-Precursors in diesen endokrinen Geweben ist. Amidorphin ist neben Metorphamid (=Adrenorphin) das einzige bisher bekannte amidierete Opioidpeptid.

Generell besitzen viele biologisch aktive Peptide eine C-terminal lokalisierte Amidgruppe, deren Anwesenheit für

die biologische Aktivität dieser Peptide wichtig ist (Mains et al., 1983). CRF z.B. besitzt in nichtamidierte Form eine 1000-fach verringerte Aktivität (Vale et al., 1981); die nichtamidierten Analoga von Gastrin und Cholezystokinin sind völlig inaktiv (Rehfeld, 1981). Im Fall der Opioidpeptide Amidorphin und Metorphamid ist jedoch die biologische Bedeutung der Amidierung unbekannt. Die C-terminale Amidgruppe von Amidorphin könnte z.B. die Selektivität der Bindung an den Opiatrezeptor beeinflussen, wie es für die C-terminale Amidgruppe von Metorphamid der Fall ist (Weber et al., 1983). Leider stand die nichtamidierte Form von Amidorphin nicht zur Verfügung, so daß diese Frage bisher nicht geklärt werden konnte. Interessanterweise ist vom Opioidpeptid β -Endorphin bekannt, daß es am C-Terminus eine zweite biologisch aktive (nicht-opioide) Stelle besitzt (Schweigerer et al., 1982). Ebenso könnte Amidorphin neben seiner opioiden Wirkung, die über den N-Terminus des Moleküls vermittelt wird, eine andere, nichtopioide Wirkung, welche über den amidierten C-Terminus vermittelt wird, besitzen.

In Hypophyse und Gehirn von Rind, Schwein und Schaf ließen sich neben authentischem Amidorphin ir-Peptide mit einem niedrigerem Molekulargewicht und kürzerer Retentionszeit auf der HPLC nachweisen, deren Hauptbestandteil sich als Amidorphin₈₋₂₆ erwies (Liebisch et al., 1986). Die anderen ir-Peptide konnten bisher nicht isoliert und sequenziert werden, da deren Konzentration sich als zu niedrig erwies. Es dürfte sich dabei aber ebenfalls um C-terminale Fragmente von Amidorphin handeln, da der immunoreaktive Peak in der Gelfiltration an einer Position eluierte, die einem niedrigerem Molekulargewicht als Amidorphin entspricht. Peptid F, das gegenüber dem Amidorphinantiserum eine geringe Kreuzreaktivität zeigt, wird von der HPLC-Säule bei einer wesentlich höheren Retentionszeit eluiert und kann deshalb nicht einem der Peaks zugeordnet werden.

Diese Ergebnisse beweisen ein unterschiedliches Processing des Proenkephalin A-Precursors in den verschiedenen Geweben. Im Gegensatz zur Nebenniere wird im hypothalamo-hypophysären System Amidorphin teilweise, und im Striatum praktisch vollständig, weiter zu Amidorphin₈₋₂₆ gespalten. Amidorphin enthält am N-Terminus die Sequenz von Met-Enkephalin, welches über die doppelbasischen Aminosäuren Lys-Lys mit Amidorphin₈₋₂₆ verbunden ist. (Abb. 14). Zwei doppelbasische Aminosäuren werden als typisches Spaltsignal für das Processing von Peptidvorläufermolekülen angesehen. Im Gehirn wird Amidorphin also vorwiegend in Met-Enkephalin und Amidorphin₈₋₂₆ gespalten. In der Nebenniere dagegen scheinen die doppelbasischen Aminosäuren Lys-Lys nicht als Spaltsignal erkannt zu werden. Diese Entdeckung ist von besonderer Bedeutung, da andere Sequenzen doppelbasischer Aminosäuren, wie Lys-Arg, die der Sequenz von Amidorphin im Proenkephalin A-Precursor vorhergehen und nachfolgen (Abb. 14), in Nebenniere und Gehirn als Spaltsignal erkannt werden. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit der hohen Spezifität der Processingenzyme, die zwischen zwei doppelbasigen Aminosäuren spalten (Loh et al., 1984; Mizuno & Matsuo, 1984). Eine ähnliche Gewebespezifität beim posttranslationalen Processing wurde im Detail für POMC und Proenkephalin B demonstriert (Mains & Eipper, 1981; Seizinger et al., 1984 a und b).

Das Proenkephalin A System im Gehirn könnte somit als Beispiel für ein Vorläufermolekül angesehen werden, in dem die Sequenz eines Opioidpeptids (Met-Enkephalin) zusammen mit einem Nicht-Opioidpeptid (Amidorphin₈₋₂₆) mit möglicherweise unterschiedlicher biologischer Wirkung vorhanden ist. Ein solches System ist auch vom Vorläufermolekül POMC bekannt, welches das Opioidpeptid β -Endorphin zusammen mit biologisch aktiven Nichtopioidpeptiden, wie ACTH und MSH,

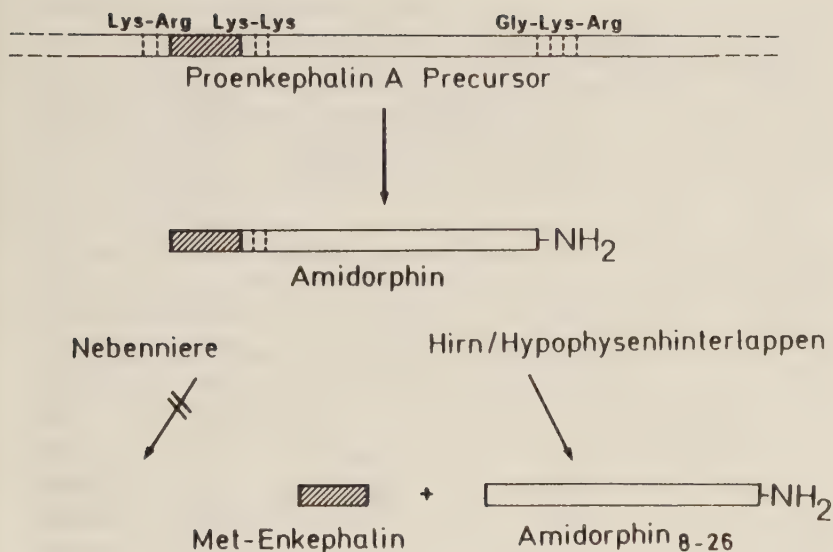


Abb. 14

Schematisch Darstellung des gewebespezifischen Processing von Amidorphin. In der Nebenniere findet ein Processing des Proenkephalin A-Precursors nur zu Amidorphin statt. In Hypophyse und Gehirn wird Amidorphin weiter zu Met-Enkephalin und Amidorphin₈₋₂₆ gespalten.

enthält (Siehe Abb. 2).

Das Vorläufermolekül als direktes Genprodukt ist in allen Zellen vorhanden. Erst durch gewebespezifisches post-translationales Processing wird also das unmittelbare biologisch aktive Produkt erzeugt, das vom Organismus in einem bestimmten Gewebe benötigt wird.

Neben der Isolierung von Amidorphin und Amidorphin₈₋₂₆ wurden in der vorliegenden Arbeit Gehirn, Hypophyse und

Nebenniere diverser Spezies auf deren Gehalt an ir-Amidorphin untersucht (Liebisch et al., 1985).

In der Nebenniere vom Rind wurde als ir-Form praktisch nur authentisches Amidorphin gefunden (Seizinger et al., 1985). In der Nebenniere des Schafs (Peak A in der Gelfiltration) wurde teilweise, beim Schwein vollständig, ein ir-Peptid gefunden, welches in der Gelfiltration an einer Position eluierte, die dem Molekulargewicht von synthetischem (Rinder-)Amidorphin entsprach, aber in der HPLC bei kürzerer Retentionszeit eluierte. Da das Amidorphinantiserum, welches hochspezifisch gegen den C-Terminus gerichtet ist, dieses ir-Amidorphin erkannte, und dieser Peak ebenfalls vom monoklonalen 3-E7-Antiserum erkannt wurde, das gegen den N-Terminus von Opioidpeptiden (mit der Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe) gerichtet ist, kann als sicher angenommen werden, daß es sich hierbei um die entsprechenden ir-Formen von Amidorphin bei Schwein und Schaf handelt. Die Unterschiede in der Retentionszeit von Schaf- bzw Schweine-Amidorphin im Vergleich zu Rinder-Amidorphin weisen allerdings auf eine unterschiedliche Primärstruktur von Amidorphin bei diesen Spezies hin. Die Sequenzen von Proenkephalin A bei Schwein und Schaf sind bisher nicht bekannt. Jedoch wurde von Micanovic et al., 1984 ein Peptid aus Schafsnebennieren isoliert und sequenziert, dessen 5 N-terminale Aminosäuren identisch mit den 5 C-terminalen Aminosäuren von Rinder-Amidorphin sind. Die Unterschiede in der Primärstruktur von Amidorphin bei Rind und Schaf können also nicht im C-terminalen Teil des Peptids liegen. Da die Kreuzreaktivität des Amidorphinantiserums somit auch gegenüber dem C-Terminus von Schaf-Amidorphin 100% betragen muß, kann angenommen werden, daß die Menge an ir-Amidorphin, die im Gewebe vom Schaf gefunden wurde, den tatsächlichen Wert widerspiegelt. Beim Schwein dagegen waren die Konzentrationen von ir-Amidorphin ca. 10 bis 100 mal niedriger als in den entsprechenden Gewe-

ben von Rind und Schaf. Dieses Resultat könnte bedeuten, daß beim Schwein ein Unterschied in der Primärstruktur des C-terminalen Teils von Amidorphin besteht, mit der Konsequenz einer erniedrigten Kreuzreaktivität des Amidorphinantiserums gegenüber dem C-Terminus von Schweine-Amidorphin, wodurch die niedrigeren Gewebespiegel von ir-Amidorphin beim Schwein erklärt wären.

In der Nebenniere des Schafs konnte neben Amidorphin auch eine ir-Form gefunden werden, die in der Gelfiltration ein höheres Molekulargewicht als Amidorphin (ca. 6000 bis 7000 Da) zeigte. Wegen der hohen C-terminalen Spezifität des Amidorphinantiserums muß es sich bei diesem Peptid um einen N-terminal verlängerten Vorläufer von Amidorphin handeln. Dieses Resultat zeigt, daß die Spaltung des Proenkephalin A-Precursors an den doppelbasischen Aminosäuren Lys-Arg, die der Amidorphinsequenz nachfolgen, und die anschließende Umwandlung von Glycin in eine Amidgruppe, der enzymatischen Spaltung der Lys-Arg-Spaltsequenz am N-Terminus von Amidorphin vorangeht.

Außer bei Rind, Schwein und Schaf wurde ir-Amidorphin auch in den entsprechenden Geweben vom Hund gefunden, nicht dagegen bei Affe, Ratte, Meerschweinchen und Huhn. Die Untersuchung über eine mögliche Existenz von Amidorphin in verschiedenen Tierarten ist von besonderem Interesse, da die Primärstruktur des Proenkephalin A-Precursors bisher von 4 verschiedenen Spezies bekannt ist und von diesen Spezies nur Rinderproenkephalin A (Noda et al., 1982) an Position 130 Glycin enthält. Bei den anderen Spezies (Mensch: Comb et al., 1982; Gubler et al., 1982; Ratte: Howells et al., 1984; Rosen et al., 1984; Yoshikawa et al., 1984; Kröte (*Xenopus Laevis*): Martens & Herbert, 1984) befindet sich an der entsprechenden Position nicht Glycin, sondern Alanin, von dem bisher nicht bekannt ist, daß es zur Amidierung einer im Precursor N-terminal vorhergehenden Aminosäure

dienen kann. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit unterstützt die Hypothese, daß tatsächlich nur Glycin als Amino-donor fungieren kann, da kein ir-Amidorphin im Gewebe der Ratte gefunden wurde. Die Tatsachen, daß beim Huhn ebenfalls kein ir-Amidorphin gefunden wurde, und daß der Proenkephalin A Precursor bei *Xenopus Laevis* in der entsprechenden Position ebenfalls Alanin enthält, lassen vermuten, daß die Mutation des Proenkephalin A-Precursors von Alanin zu Glycin erst an einem späteren Punkt der evolutionären Entwicklung erfolgte und somit erst zum Zeitpunkt der Wirbeltierentwicklung auftrat.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Isolierung und Charakterisierung eines neuen amidierten Opioidpeptids, das Amidorphin genannt wurde.

Amidorphin wurde aus der Nebenniere des Rindes isoliert. Die Struktur wurde durch Aminosäure- und Sequenzanalyse bestimmt. Das Peptid besitzt eine C-terminal lokalisierte Amidgruppe. C-terminale Amidierung wird als wesentlich für die Funktion vieler endogener Nichtopioideptide angesehen und scheint von Bedeutung für die Regulation der biologischen Aktivitäten dieser Peptide zu sein. Daher ist die Existenz dieses, neben Metorphamid (=Adrenorphin) (Weber et al., 1983; Matsuo et al., 1983), ersten amidierten endogenen Opioidpeptids, von besonderem Interesse, da es neben seiner Opiatwirkung, die von den ersten Aminosäuren des N-Terminus vermittelt wird, möglicherweise noch eine weitere, über den C-Terminus vermittelte biologische Aktivität besitzt. Amidorphin stammt wie Metorphamid aus dem Opioidpeptidvorläufermolekül Proenkephalin A.

Außer in der Nebenniere, in der Amidorphin hoch konzentriert vorkommt, wurde Amidorphin-Immunoreaktivität im Gehirn und in der Hypophyse gefunden. Während in der Nebenniere Amidorphin nur in authentischer Form auftritt, wurde Amidorphin-Immunoreaktivität in Gehirn und Hypophyse hauptsächlich - im Striatum sogar praktisch vollständig - als N-terminal verkürzte, nicht opiataktive Form, Amidorphin₈₋₂₆ bestimmt. Amidorphin₈₋₂₆ wurde aus dem Striatum des Rindes isoliert und sequenziert.

Weiterhin wurde die ir-Verteilung von Amidorphin in den Geweben verschiedener Spezies untersucht. Ir-Amidorphin wurde bei Rind, Schaf, Schein und Hund gefunden, nicht dagegen bei Affe, Ratte, Meerschweinchen und Huhn.

Die unterschiedliche ir-Verteilung von Amidorphin in den Geweben von Gehirn, Hypophyse und Nebenniere läßt auf ein gewebespezifisches Processing des Vorläufermoleküls Pro-enkephalin A schließen. Im Gegensatz zur Nebenniere wird im hypothalamo-hypophysären System Amidorphin teilweise, und im Striatum sogar praktisch vollständig, in das Opioidpeptid Met-Enkephalin und das Nichtopioidpeptid Amidorphin₈₋₂₆ gespalten.

7. LITERATUR

- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immuno-globulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J. Cell. Biol. 67, 835-851
- Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N. & Guillemin, R. (1978) Neurons containing β -endorphin in rat brain exists separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 75, 1591-1595
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Birdsall, N.J.M. & Hulme, E.C. (1976) C-fragment of lipotropin has high affinity for brain opiate receptors. Nature 260, 793-795
- Bradbury, A.F., Finnie, M.D.A. & Smyth, D.G. (1982) Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. Nature 298, 686-688
- Civelli, O., Douglass, J., Goldstein, A. & Herbert, E. (1985) Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 82, 4291-4295
- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. & Herbert, E. (1982) Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its m-RNA. Nature 295, 663-664
- Dandekar, T., Gramsch, C., Houghten, R.A. & Schulz, R. (1985) Affinity purification of β -endorphin-like material from NG 108 CC 15 hybrid cells by means of the monoclonal β -endorphin antibody 3-E7. Neurochem. Int. 7, 247-253

- Duka, T., Höllt, V., Przewłocki, R. & Wesche, D. (1978) Distribution of methionine- and leucine-enkephalin within the rat pituitary gland measured by highly specific radioimmunoassays. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1119-1127
- Fricker, L.D. & Snyder S.H. (1983) Purification and Characterization of Enkephalin Convertase, an Enkephalin-synthesizing Carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 258, 10950-10955
- Giraud, A.S., Williams, R.G. & Dockray, G.J. (1984) Evidence for different patterns of post-translational processing of pro-enkephalin in the bovine adrenal, colon and striatum indicated by radioimmunoassay using region-specific antisera to met-enk-Arg⁶-Phe⁷ and met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸. Neurosci. Lett. 46, 223-228
- Glowinsky, J. & Iversen, L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. Disposition of ³H-norepinephrine, ³H-dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. J. Neurochem. 13, 655-669
- Goldstein, A. Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. & Hood, L. (1979) Dynorphin₁₋₁₃, an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6666-6670
- Goldstein, A., Fischli, F., Lowney, L.J., Hunkapiller, M & Hood, L. (1981) Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7219-7223
- Gramsch, C., Meo, T., Riethmüller, G. & Herz, A. (1983) Binding characteristics of a monoclonal β -endorphin antibody recognizing the N-terminus of opioid peptides. J. Neurochem. 40, 1220-1226

- Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P. & Udenfriend, S. (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. Nature 295, 206-208
- Guillemin, R., Ling, N. & Burgus, R. (1976) Endorphins, peptides d'origine hypothalamique et neurohypophysaire à activité morphinomimétique. Isolement et structure moléculaire de l' α -endorphine. C.R. Acad. Sc. (Paris) 282, 783-785
- Heinrikson, R.L. & Meredith, S.C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem. 136, 65-74.
- Höller, V., Przewlocki, R. & Herz, A. (1978) Radioimmunoassay of β -endorphin. Basal and stimulated levels in extracted rat plasma. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 171-174
- Horikawa, S., Takai, T., Toyosato, M., Takahashi, H., Noda, M., Kakidani H., Kubo, T., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. & Numa, S. (1983) Isolation and structural organisation of the human preproenkephalin B gene. Nature 306, 611-614
- Howells, R.D., Kilpatrick, D.L., Bhatt, R., Monahan, J.J., Poonian, M. & Udenfriend, S. (1984) Molecular cloning and sequence determination of rat preproenkephalin cDNA: Sensitive probe for studying transcriptional changes in rat tissues Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7651-7655
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. & Morris, H.R. (1975) Identification of two related peptideptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258, 577-579

- Hughes, J., Kosterlitz, H.W. & Smith T.W (1977) The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. Br. J. Pharmac. 61, 639-647
- Hunkapiller, M.W. & Hood, L.E. (1983) Analysis of phenylthiohydantoins by ultrasensitive gradient high-performance liquid chromatography. Meth. Enzym. 91, 486-493
- Hunter, W.M. & Greenwood, F.C. (1962) Preparation of iodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194, 495-496
- Jones, B.N., Stern A.S., Lewis, R.V., Kimura S., Stein, S., Udenfriend, S. & Shively, J.E. (1980) Structure of two adrenal polypeptides containing multiple enkephalin sequences. Arch. Biochem. Biophys. 204, 392-395
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. & Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-endorphin/dynorphin precursor. Nature 298, 245-249
- Kangawa, K., Minamino, N., Chino, N., Sakokibara, S. & Matsuo, H. (1981) The complete amino acid sequence of α -neo-endorphin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 871-878
- Kilpatrick, D.L., Jones, B.N., Kojima K. & Udenfriend S. (1981a) Identification of the octapeptide (Met)-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ in extracts of bovine adrenal medulla. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 698-705
- Kilpatrick, D.L., Takashi, T., Jones, B.N., Stern, A.S., Shively, J.E., Hullihan, J., Kimura, S., Stein, S. & Udenfriend, S. (1981b) A highly potent 3200-dalton adrenal opioid peptide that contains both a (Met-) and (Leu-) enkephalin sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3265-3268

- Kilpatrick, D.L., Wahlström, A., Lahm, H.W., Blacher, R. & Udenfriend, S. (1982) Rimorphin, a unique, naturally occurring (Leu)-enkephalin-containing peptide found in association with dynorphin and α -neo-endorphin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6480-6483
- Liebisch, D.C., Seizinger, B.R., Michael, G. & Herz, A. (1985) The novel opioid peptide amidorphin: Characterization and distribution of amidorphin-like immunoreactivity in bovine, ovine and porcine brain, pituitary and adrenal medulla. J. Neurochem. 45, 1495-1503
- Liebisch, D.C., Weber, E., Kosicka, B., Gramsch, C., Herz, A. & Seizinger, B.R. (1986) Isolation and structure of a C-terminally amidated non-opioid peptide, amidorphin(8-26) from bovine striatum: A major gene product of proenkephalin in brain, but not in adrenal medulla. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1936-1940
- Lindberg, I., Yang, H.-Y.T. & Costa, E. (1983) A high molecular weight form of met⁵-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ in rat brain and bovine adrenal chromaffin granules. Life Sci. 33 (Sup. I), 5-8
- Ling, N., Burgus, R. & Guillemin, R. (1976) Isolation, primary structure and synthesis of α -endorphin and γ -endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3942-3946
- Lingappa, V.A., Katz, F.N., Lodish, H.F. & Blobel, G. (1978) A signal sequence for the insertion of a transmembrane glycoprotein. J. Biol. Chem. 253: 8667-70
- Loh, Y.P., Brownstein, M.J. & Gainer, H. (1984) Proteolysis in neuropeptide processing and other neural functions. Ann. Rev. Neurosci. 7, 189-22
- Mains, R.E., Eipper, B.A. & Ling, N. (1977) Common precursor to corticotropin and endorphins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3014-3018

- Mains, R.E. & Eipper, B.A. (1981) Differences in the post-translational processing of β -endorphin in rat anterior and intermediate pituitary. J. Biol. Chem. **256**, 5683-5688
- Mains, R.E., Eipper, B.A., Glembotski, C.C. & Doros, R.M. (1983) Strategies of the biosynthesis of bioactive peptides. Trends in Pharmac. Sci. **6**, 229-235
- Martens, G.J.M. & Herbert, E. (1984) Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. Nature **310**, 251-254
- Mason, A.J., Evans, B.A., Cox, D.R., Shike, J. & Richards, R.I. (1983) Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. Nature **303**, 300-307
- Matsuo, H., Miyata, A. & Mizuno K. (1983) Novel C-terminally amidated opioid peptide in human pheochromocytoma tumor. Nature **305**, 721-723
- Micanovic, R., Ray, P., Kruggel, W. & Lewis, R.V. (1984) Purification and sequence of an opioid peptide derived from ovine proenkephalin. Biochem. Biophys. Res. Commun. **118**, 299-303
- Minamino, N., Kangawa, K., Fukuda, A. & Matsuo, H. (1980) A new opioid octapeptide related to dynorphin from porcine hypothalamus. Biochem. Biophys. Res. Commun. **95**, 1475-1481
- Minamino, N., Kitamura, K., Hayashi, J., Kangawa, K. & Matsuo, H. (1981) Regional distribution of α -neo-endorphin in rat brain and pituitary. Biochem. Biophys. Res. Commun. **102**, 226-234
- Mizuno, K., Minomino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. (1980a) A new endogenous opioid peptide from bovine adrenal medulla: Isolation and amino acid sequence of a dodecapeptide (BAM-12P). Biochem. Biophys. Res. Commun. **95**, 1482-1488

- Mizuno, K., Minomino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. (1980b) A new family of endogenous "big" met-enkephalins from bovine adrenal medulla: Purification and structure of docosa- (BAM-22P) and eicosapeptide (BAM-20P) with very potent opiate activity. Biochem. Biophys Res. Commun. 97, 1283-1290
- Mizuno, K., & Matsuo, H. (1984) A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues. Nature 309, 558-568
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. & Numa, S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. Nature 278, 423-427
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. & Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature 295, 202-206
- Notake, M., Tobimatsu, T., Watanabe, Y, Takahashi, H., Mishina, M. & Numa, S. (1983) Isolation and characterization of the mouse corticotropin- β -lipotropin precursor gene and a related pseudogene. FEBS Lett. 156, 67-71
- Pittius, C.W., Kley, N., Loeffler J.P. & Höllt, V. (1985) Quantitation of proenkephalin A messenger RNA in bovine brain, pituitary and adrenal medulla: Correlation between mRNA and peptide levels. EMBO J. 4, 1257-1260
- Pert, C.B. & Snyder, S.H. (1973) Opiate receptors: Demonstration in nervous tissue. Science 179, 1011-1014
- Rehfeld, J.F. (1981) Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. Am. J. Physiol. 240(G) 255-266
- Rosen, H., Douglas, J. & Herbert, E. (1984) Isolation and characterization of the rat proenkephalin gene. J. Biol. Chem. 259, 14309-14313

- Rossier, J.R., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.R. & Guillemin, R. (1977) Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5126-5165
- Rossier J., Audigier Y., Ling, N., Cros, J. & Udenfriend S. (1980) Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷, present in high amounts in brain of rat, cattle, and man, is an opioid antagonist. Nature 288, 88-90
- Rubinstein, M., Stein, S. & Udenfriend, S. (1978) Characterization of pro-opiocortin, a precursor to opioid peptides and corticotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 669-671
- Schweigerer, L., Bhakdi, S. & Teschemacher, H. (1982) Specific non-opiate binding sites for human β -endorphin on the terminal complex of human complement. Nature 296, 572-574
- Seizinger, B.R., Höllt, V. & Herz, A. (1981a) Evidence for the occurrence of the opioid octapeptide dynorphin₁₋₈ in the neurointermediate pituitary of rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 197-205
- Seizinger, B.R., Höllt, V. & Herz, A. (1981b) Evidence for an opiate-inactive N-acetylated derivative of leucine-enkephalin in the rat neurointermediate pituitary. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 289-297
- Seizinger, B.R., Grimm, C., Höllt, V. & Herz, A. (1984a) Evidence for a selective processing of proenkephalin B into different opioid peptide forms in particular regions of rat brain and pituitary. J. Neurochem. 42, 447-457
- Seizinger, B.R., Höllt, V. & Herz, A. (1984b) Proenkephalin B (Prodynorphin)- derived opioid peptides: Evidence for a differential processing in lobes of the pituitary. Endocrinol. 115, 662-671

- Seizinger, B.R., Liebisch, D.C., Gramsch, C., Herz, A., Weber, E., Evans, C.J., Esch, F.S. & Böhlen, P. (1985) Isolation and structure of a novel C-terminally amidated opioid peptide, amidorphin, from bovine adrenal medulla. Nature 313, 57-59
- Simon, E.J., Hiller, J.M. & Edelman, J. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^3H -etorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1947-1949
- Stern, A.S.; Lewis, R.V., Kimura, S., Rossier, J., Gerber, L.D., Brink, L., Stein, S. & Udenfriend, S. (1979) Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin($\text{Arg}^6, \text{Phe}^7$) from bovine adrenal medullary granules and striatum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6680-6683
- Suda, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Sakamoto, M., Yanaihara, N., Numa, S. & Imura, H. (1983) A novel opioid peptide, leumorphin, acts as an agonist at the κ -opiate receptor. Life Sci. 32, 2769-2775
- Supattapone, S., Fricker, L.D. & Snyder, S. (1984) Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, "enkephalin convertase." J. Neurochem. 42, 1017-1023
- Tachibana, S., Araki, K., Ohya, S. & Yoshida, S. (1982) Isolation and structure of dynorphin, an opioid peptide from porcine duodenum. Nature 295, 339-340
- Takahashi, H., Teranishi, Y., Nakanishi, S. & Numa, S. (1981) Isolation and structural organization of the human corticotropin- β -lipotropin precursor gene. FEBS Lett. 135, 97-102
- Tanaka, T., McRae, B.J., Cho, K., Fraki, J.E., Johnson, D.A. & Powers, J.C. (1983) Mammalian tissue trypsin-like enzymes. J. Biol. Chem. 258, 13552-13557

- Terenius, I. (1973) Stereospecific interactions between narcotic analgetics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta pharmacol. (Kbh.) **33**, 377-384
- Troy, C.M. & Musacchio, J.M. (1982) Processing of enkephalin precursors by chromaffin granule enzymes. Life Sci. **31**, 1717-1720
- Turner, A.J. (1984) Neuropeptide processing enzymes. Trends in Neurosci. **6**, 258-260
- Vale, W., Spiess J., Rivier, C. & Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. Science **213**, 1394-1397
- Weber, E., Evans, Ch.J. & Barchas, J.D. (1982) Predominance of the amino-terminal octapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions. Nature **299**, 77-79
- Weber, E., Esch, F.S., Böhlen, P., Paterson, S., Corbett, A.D., McKnight, A.T., Kosterlitz, H.W., Barchas, J.D. & Evans, C.J. (1983) Metorphamide: Isolation, structure and biological activity of an amidated opioid octapeptide from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 7362-7366
- Yoshikawa, K., Williams, C. & Sabol, S.L. (1984) Rat brain proenkephalin mRNA J. Biol. Chem. **259**, 14301-14308

Meinen herzlichsten Dank spreche ich hiermit Prof. Dr. Albert Herz und Prof. Dr. Wolfgang Forth aus, deren stete menschliche und wissenschaftliche Unterstützung mir eine notwendige Hilfe waren.

Besonders verbunden fühle ich mich Dr. med. Bernd R. Seizinger für seine persönliche Unterstützung und seinen sehr kompetenten wissenschaftlichen Beistand.

Herzlichen Dank an Greg Michael und Barbara Kosicka, die mir während meiner Zeit am Institut eine große Hilfe waren.

Ferner danke ich auch Dr. E. Weber für die Durchführung der Sequenz- und Aminosäureanalysen, Dr. Christian Gramsch, Dr. Rainer M. Arendt, Ursula Bäumle und allen anderen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Lebenslauf Daniel C. Liebisch

Geboren am 1. September 1955 in München

Vater: Adolf Liebisch, Architekt

Mutter: Renate Liebisch, Hausfrau

1961 - 1964 Volksschule an der Feldbergstraße, München

1964 - 1966 Volksschule an der Rotbuchenstraße, München

1966 - 1976 Albert-Einstein-Gymnasium, München

Juni 1976 Abiturprüfung

Nov. 1976 Beginn des Studiums "Chemie-Diplom" an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Juni 1981 mündliche Diplom-Hauptprüfung (Wahlfach Biochemie)

Sept. 1981 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für
bis Sept. 1982 Psychiatrie, Abt. Neurochemie, in Martinsried bei München.

Jan. 1983 Promotion am Max-Planck-Institut für Psychia-
bis Dez. 1985 trie, Abt. Neuropharmakologie

